

健康危機管理対応模擬訓練における 農薬グリホサートの分析について

保健科学課 微量分析担当

1 はじめに

地方衛生研究所全国協議会地域保健総合推進事業の一環として、毎年九州ブロック内の地方衛生研究所（以下、「地衛研」とする。）を対象に模擬訓練が実施され、福岡市保健環境研究所も参加している。本訓練は、健康危機事案発生時における検査体制の整備を目的としており、健康被害発生時に原因物質を推定し、定性及び定量を行うものである。

令和2年度の模擬訓練において、本市では原因物質の候補の一つとしてグリホサートを分析することとなったが、当所では分析法を整備していなかった。そこで、文献^{1, 2)}を参考に、高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（以下、「LC-MS/MS」とする。）を用いた簡易かつ迅速な分析法を検討し、液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計（以下、「LC-QTOFMS」とする。）を用いて確認試験を実施したので報告する。

2 分析方法

2.1 試料

模擬検体：豚汁

添加回収用ブランク試料：市販のインスタント味噌汁（具なし）

2.2 試薬等

標準品：Riedel-de Haën 社製

アセトニトリル：前処理は関東化学社製の高速液体クロマトグラフィー用、移動相は Honeywell 社製 LC/MS 用を使用した。

標準原液：標準品 2 mg を水で 20 mL にメスアップし 100 µg/mL とした。

メタノール：Honeywell 社製 LC/MS 用

標準溶液：標準原液を水で適宜希釈した。

ギ酸：富士フイルム和光純薬工業社製 ギ酸（約 99%）LC/MS 用

ギ酸アンモニウム：富士フイルム和光純薬工業社製 1 mol/L ギ酸アンモニウム水溶液 高速液体クロマトグラフ用

リン酸：富士フイルム和光純薬工業社製 試薬特級

水：前処理は蒸留水製造装置で処理した水、移動相は Honeywell 社製 LC/MS 用を使用した。

蒸留水製造装置：ADVANTEC 社製 RFD240NC

超音波洗浄器：アズワン社製 MCS-10

遠心分離器：久保田製作所製 S700FR

メンブレンフィルター：ADVANTEC 社製 DISMIC 13HP PTFE (0.2 µm)

2.3 装置

LC-MS/MS：LC 部；Agilent 社製 1260 Infinity, MS 部；AB SCIEX 社製 TQ5500

LC-QTOFMS：LC 部；AB SCIEX 社製 Exion LC AC, MS 部；AB SCIEX 社製 X500R Q TOF システム

2.4 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に、測定イオンを表 2 に示す。LC-QTOFMS の測定条件は表 3 に示す。LC-MS/MS の測定条件は、AB SCIEX 社製の Analyst ソフトウェアを用いて、MS 内部パラメーターの自動最適化及びイオンソースの最適化を行い決定した。

表 1 LC-MS/MS の測定条件

分析カラム	SeQuant社製 ZIC-pHILIC (50 mm×2.1 mm, 5 µm)
カラム温度	30℃
注入量	5 µL
移動相	A液：10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B液：0.05% ギ酸及び 80 mmol/L ギ酸アンモニウム含有水・アセトニトリル（1：1）混液
グラジエント条件	B液：2% (0 min)-2% (2 min)-100% (6 min)-100% (20 min)-2% (20.1 min)-2% (30 min)
流速	0.4 mL/min
イオン化法	ESI（ネガティブモード）
測定モード	MRM
イオンスプレー電圧	-4500 V
イオンソース温度	600℃
カーテンガス	30 psi
ネブライザーガス	70 psi
ターボガス	80 psi
コリジョンガス	4 psi
コーン電圧	-70 V
取り込み時間	150 msec

表2 LC-MS/MS の測定イオン

Compound	Q1(<i>m/z</i>)	Q3(<i>m/z</i>)	CXP(V)	CE(V)
Glyphosate1	167.8	63.0	-9.0	-28.0
Glyphosate2	167.8	80.9	-11.0	-20.0
Glyphosate3	167.8	79.0	-7.0	-52.0
Glyphosate4	167.8	124.1	-7.0	-16.0
Glyphosate5	167.8	79.8	-7.0	-34.0
Glyphosate6	167.8	110.0	-5.0	-24.0

表3 LC-QTOFMS の測定条件

分析カラム	Imtakt社製 Scherzo SM-C18 (2.0 mm×50 mm, 3 μm)
カラム温度	40℃
注入量	5 μL
移動相	A液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム 水溶液 B液: メタノール
グラジエント条件	B液: 1%(0 min)-99%(2.5 min)-99%(5 min) -1%(5.01 min)-1%(7 min)
流速	0.4 mL/min
イオン化法	ESI (ネガティブモード)
測定モード	IDA
イオンスプレー電圧	-4500 V
イオンソース温度	500℃
TOFMSスキャン範囲	<i>m/z</i> 100-2000
TOFMS/MSスキャン範囲	<i>m/z</i> 30-1000
コーン電圧	-80 V
カーテンガス	30 psi
ネブライザーガス	50 psi
ターボガス	60 psi
コリジョンガス	7 psi
コリジョンエネルギー (TOFMS)	-5 V
コリジョンエネルギー (TOFMS/MS)	-35 V

2.5 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図1に示す。

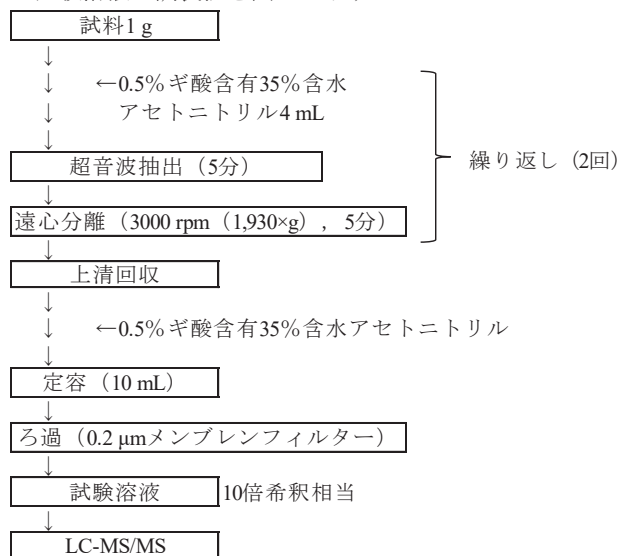


図1 試験溶液調製のフローチャート

3 分析結果

グリホサートは通常の測定成分ではないため、富永ら、吉田らの報告^{1, 2)}を参考に、メソッドの作成及び測定条件の検討を行った。高極性化合物であるグリホサートを測定するため、当初、固定相に強イオンリガンドを持つ Imtakt 社製 Scherzo SS-C18 カラムを使用し 1 mg/L の標準溶液を測定したが、ピークを確認できなかった。そこで、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（以下、「HILIC」とする。）に変更し標準溶液を測定した。その結果、リテンションタイム 0.3 分にピークを検出し、0.2 mg/L で十分な S/N が得られた。グリホサートは金属吸着を起こしやすくテーリングするため¹⁾、事前に流路を 0.2% リン酸水溶液でコーティングし測定したところ、良好なピーク形状が得られた（図2）。

グリホサートの ARfD（急性参照用量）は設定する必要なしとされている³⁾ことから、健康被害が生じる濃度は高濃度であると考えられるため、0.2, 0.5, 1 mg/L の3点で定量し、0.2 mg/kg 未満であることを確認した。検量線の決定係数は 0.99 以上であった（図3）。

実際の危機管理事案発生時にはブランク試料を入手することが困難であると考えられる。模擬検体が豚汁であったことから、性質の類似した市販のインスタント味噌汁（具なし）をブランク試料とし、0.5 mg/kg (n=1) で添加回収試験を実施した。プロダクトイオン 80.9, 79.8 及び 110.0 からは、夾雑成分由来と考えられる妨害ピークが確認され、十分な選択性が得られなかったことから、プロダクトイオン 63.0 を定量イオンとし回収率を算出した。溶媒標準溶液で定量した回収率は 39% であったため、マトリックス標準溶液で補正したところ 83% の回収が得られた（図4）。

次に、LC-QTOFMS による確認試験を実施した結果、トータルイオンクロマトグラムから、AB SCIEX 社製の解析ソフト（SCIEX OS Software）を用いてグリホサート（分子式：C₃H₈NO₅P、モノアイソトピック質量：169.014）の脱プロトン化分子（*m/z* 168.007）について抽出したところ、標準溶液ではリテンションタイム約 1.3 分にピークが確認できたが、試験溶液では当該ピークは確認されず、不検出であった（図5）。

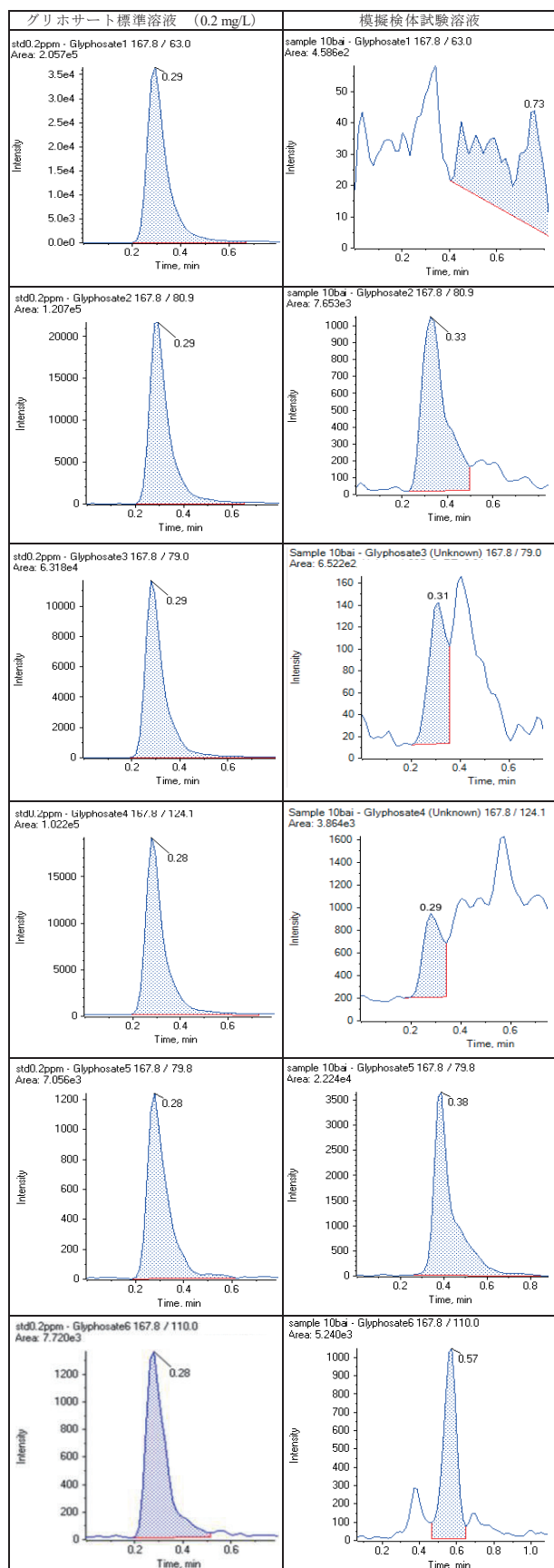


図2 LC-MS/MS 分析における標準溶液 0.2 mg/L (左) 及び模擬検体試験溶液 (右) のクロマトグラム

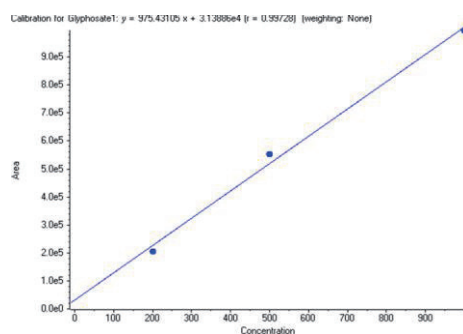


図3 LC-MS/MS 分析の検量線

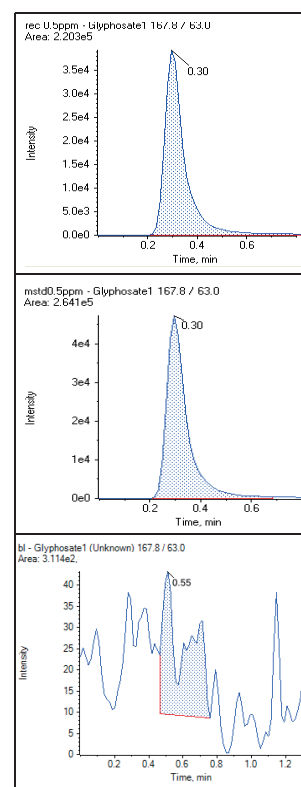


図4 LC-MS/MS 分析における添加回収試験溶液 (上段), マトリックス標準溶液 0.5 mg/L (中段) 及びブランク試料溶液 (下段) のクロマトグラム

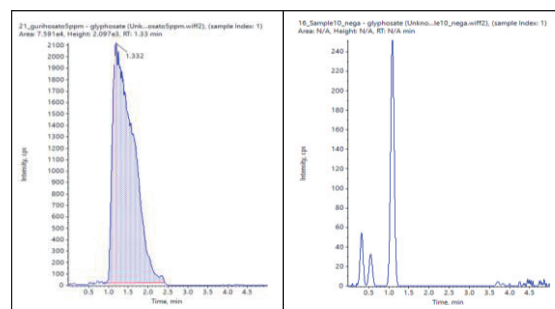


図5 LC-QTOFMS 分析における標準溶液 5 mg/L (左) 及び模擬検体試験溶液 (右) のクロマトグラム

4 まとめ

グリホサートは、通常の測定成分ではないため、分析法から検討する必要があり当初対応に苦慮したが、HILICで分析することで、模擬試料に含まれる原因物質の可能性を否定することができた。添加回収試験においても、良好な値が得られた。

また、LC-QTOFMSを用いても当該ピークは確認されず不検出であり、グリホサートが原因物質ではないことを確認できた。HILICは平衡化に時間を要することから、今後、カラムや測定条件について検討の余地がある。

文献

- 1) 富永純司，他：LC/MS/MSによる高極性農薬の一斉分析法の開発，第56回全国衛生化学技術協議会年会講演集，食-18，74～75，2019
- 2) 吉田達雄，他：HILIC-MS/MSによる飲料中グリホサート，グルホシネート及び代謝物分析法の開発，熊本県保健環境科学研究所報（42），40～45，2012
- 3) 食品安全委員会委員長通知：食品健康影響評価の結果の通知について，府食第443号，平成28年7月12日